

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4387309号
(P4387309)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/715 (2006.01)

C O 7 K 14/715

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 13 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-548452 (P2004-548452)
 (86) (22) 出願日 平成15年10月24日(2003.10.24)
 (65) 公表番号 特表2006-518985 (P2006-518985A)
 (43) 公表日 平成18年8月24日(2006.8.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/033718
 (87) 国際公開番号 W02004/039951
 (87) 国際公開日 平成16年5月13日(2004.5.13)
 審査請求日 平成18年8月1日(2006.8.1)
 (31) 優先権主張番号 10/282,162
 (32) 優先日 平成14年10月28日(2002.10.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 597160510
 リジェネロン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 REGENERON PHARMACEU
 TICALS, INC.
 アメリカ合衆国10591-6707ニュ
 ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
 ・ミル・リバー・ロード777番
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-1 レセプターを基礎にしたアンタゴニストならびに作製および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 7 の配列を含む単離された核酸分子であって、インターロイキン - 1 (IL - 1) を結合して非機能的複合体を形成し得るマルチマーを形成する融合ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 8 の配列を含む融合ポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 4】

発現制御配列に作動可能に連結された請求項 1 または 2 に記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の発現ベクターを含む、融合ポリペプチドの産生に適切な宿主細胞。

【請求項 6】

前記宿主細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

前記宿主細胞が、CHO 細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

10

20

【請求項 8】

融合ポリペプチドを産生する方法であって、
請求項 6 に記載の宿主細胞を該融合ポリペプチドの産生を許容する条件下で増殖させる工程、及びこのように産生された該融合ポリペプチドを回収する工程を包含する、方法。

【請求項 9】

配列番号 7 の前記核酸が、以下：

- (a) 配列番号 7 のヌクレオチド 1 0 4 3 が A から C に改変されている；及び
- (b) ヌクレオチド T C C G G A が、ヌクレオチド 1 0 7 7 と 1 0 7 8 との間に挿入されている；

の 1 つ以上の改変を含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 10】

請求項 1 または 9 に記載の核酸分子によってコードされる融合ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 8 のアミノ酸配列を含む、融合ポリペプチド。

【請求項 12】

IL - 1 を結合して、請求項 11 に記載の融合ポリペプチドを含む非機能的複合体を形成し得る、マルチマー。

【請求項 13】

ダイマーである、請求項 12 に記載のマルチマー。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】**【0001】**

本発明は、今や放棄された 1998 年 9 月 25 日に出願された米国仮出願第 60 / 101, 858 号の優先権を主張し、特許されている 1999 年 5 月 19 日に出願された米国出願第 09 / 313, 942 号に対する優先権を主張する、1999 年 9 月 22 日に出願された国際出願番号第 PCT / US99 / 22045 号の米国国内段階出願である 2001 年 3 月 22 日に出願された米国出願第 No. 09 / 787, 835 号の一部継続出願である。本出願を通じて種々の刊行物が参照される。これら刊行物の開示は、それらの全体が本出願中に参考として援用される。

【背景技術】

30

【0002】

CNTF ファミリーサイトカインは、アンタゴニストおよびアゴニストの両方の潜在的な治療適用を提供する広範な種類の生理学的プロセスで重要な役割を演じている。

【発明の開示】**【課題を解決するための手段】****【0003】**

(発明の要旨)

本発明の目的は、サイトカイン関連疾患または障害の処置で有用であるサイトカインアンタゴニストの産生である。

【0004】

40

本発明の別の目的は、サイトカイン関連疾患または障害の処置のための開示されたサイトカインアンタゴニストの使用である。

【0005】

本発明の別の目的は、各々は異なる配列を有するが、すべてが IL - 1 のそのレセプターの結合をブロックし得、それ故、IL - 1 アンタゴニストとして作用する、IL - 1 Trap と称されるいくつかの特異的な IL - 1 サイトカインアンタゴニストの構築である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0006】**

(発明の詳細な説明)

50

本発明は、サイトカインを結合して以下を含む非機能的な複合体を形成し得る融合ポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する：(a) サイトカインのレセプターの特異性決定成分の細胞外ドメインのサイトカイン結合性部分のアミノ酸配列を含む第1の融合ポリペプチド成分をコードするヌクレオチド配列；(b) サイトカインのレセプターのシグナル伝達成分の細胞外ドメインのサイトカイン結合性部分のアミノ酸配列を含む第2の融合ポリペプチド成分をコードするヌクレオチド配列；および(c) マルチマー成分のアミノ酸配列を含む、第3の融合ポリペプチド成分をコードするヌクレオチド配列。

【0007】

「サイトカイン結合性部分」によって意味されるのは、サイトカインを結合するために必要な細胞外ドメインの最小部分である。当業者によって、サイトカインレセプターを規定する特徴は、規準システインを含む2つのフィブロネクチン様ドメインおよびWSXWSボックス(配列番号26)(Bazan(1990)PNAS 87:6934~6938)の存在であることが受容されている。サイトカインのレセプターの結合性成分の細胞外ドメイン、およびサイトカインのレセプターのシグナル伝達成分の細胞外ドメインをコードする配列また、本発明の融合ポリペプチドを生成するために用いられ得る。同様に、サイトカインのレセプターの成分のより大きな部分をコードするより長い配列が用いられ得る。しかし、この細胞外ドメインのより小さなフラグメントが、サイトカインを結合するよう機能し、そしてそれ故、本発明は、サイトカイン結合性部分としてサイトカインを結合するために必要な細胞外ドメインの最小部分を含む融合ポリペプチドを企図する。

【0008】

本発明は、サイトカインのレセプターの「特異性決定成分」およびサイトカインのレセプターの「シグナル伝達部分」を含む。サイトカインレセプターの特定の成分またはサブユニットを指すために用いられる命名法にかかわらず、当業者は、レセプターのどの成分またはサブユニットがサイトカインの細胞標的を決定する原因であるかを認識し得、そしてそれ故、どの成分が「特異性決定成分」を構成するのかわかり得る。同様に、用いられる命名法にかかわらず、当業者は、レセプターのどの成分またはサブユニットが、「シグナル伝達成分」を構成し得るのかわかり得る。本明細書で用いられるとき、この「シグナル伝達成分」は、特異性決定成分ではなく、そしてこの特異性決定成分の不在でサイトカインを結合しないか、または弱く結合する、特異性決定成分ではないネイティブなレセプターである。ネイティブなレセプターでは、この「シグナル伝達成分」は、シグナル伝達に参加し得る。

【0009】

本発明の融合ポリペプチドをコードする核酸配列を調製することにおいて、この融合ポリペプチドの第1、第2、および第3の成分は、一本鎖のヌクレオチド中にコードされ、これは、宿主ベクター系によって発現されるとき、この融合ポリペプチドのモノマー種を産生する。このように発現されたモノマーは、次いで、マルチマー(となる)成分(第3の融合ポリペプチド成分)間の相互作用に起因してマルチマーとなる。この様式で融合ポリペプチドを産生することは、第1および第2の成分が別個の分子として産生され、そして次にマルチマーとされる場合に生じ得るヘテロダイマー混合物の生成の必要性を避ける。例えば、1995年11月28日に発行された米国特許第5,470,952号は、CNTFまたはIL-6アンタゴニストとして機能するヘテロダイマータンパク質の産生を記載している。これらヘテロダイマーは、適切な α (a)および β (b)成分で同時トランスフェクトされた細胞株から生成される。次いで、ヘテロダイマーを、調製用非変性ポリアクリルアミドゲルからの受動的溶出のような方法を用いるか、または高速カチオン交換クロマトグラフィーを用いることにより、ホモダイマーから分離される。この精製ステップの必要性は、本発明の方法により避けられる。

【0010】

さらに、ダイマーIL-4インヒビターと題する1996年4月18日に公開されたPCT国際出願WO 96/11213は、出願人が、2つのIL-4レセプターがポリマー性スパーサーによって結合されるホモダイマーを調製し、そしてIL-4レセプターが

ポリマースペーサーによってIL-2レセプター γ 鎖に連結されているヘテロダイマーを調製したことを記述している。記載されるポリマー性スペーサーは、ポリエチレングリコール(PEG)である。2つのレセプター成分、IL-4RおよびIL-2R γ は、別個に発現かつ精製される。ペグ化(peglylated)ホモダイマーおよびヘテロダイマーが、次に、これら成分を、2官能性PEG試薬を用いて一緒に連結することにより産生される。このような時間を消費し、かつコストのかかる精製およびペグ化工程を避けることが本はつめの利点である。

【0011】

本発明の1つの実施形態では、第1の成分をコードするヌクレオチド配列は、第2の成分をコードするヌクレオチド配列の上流にある。本発明の別の実施形態では、第1の成分をコードするヌクレオチド配列は、第2の成分をコードするヌクレオチド配列の下流にある。本発明のさらなる実施形態は、第1、第2および第3の融合ポリペプチド成分の順序が再配列されて調製され得る。例えば、第1の成分をコードするヌクレオチド配列が1で指定され、第2の成分をコードするヌクレオチド配列が2で指定され、そして第3の成分のヌクレオチド配列が3で指定されるとき、本発明の単離された核酸中の成分の順序は、5'~3'まで読まれるとき、以下の6つの組み合わせのいずれかであり得る：1、2、3；1、3、2；2、1、3；2、3、1；3、1、2；または3、2、1。

【0012】

本発明の特定の実施形態では、融合ポリペプチドによって結合されるサイトカインは、インターロイキン-1(IL-1)である。

【0013】

本発明の好ましい実施形態では、上記マルチマー成分は、免疫グロブリン由来ドメインを含む。より特定すれば、この免疫グロブリン由来ドメインは、IgGのFcドメイン、IgGの重鎖、およびIgGの軽鎖からなる群から選択され得る。なおより特定すれば、免疫グロブリンドメインは、IgG₁またはIgG₄のFcドメイン、IgG₁またはIgG₄の重鎖、およびIgG₁またはIgG₄の軽鎖からなる群から選択され得る。別の実施形態では、このマルチマー成分は、最初の5つのアミノ酸(システインを含む)が除去されてFc(DC1)と称されるマルチマー成分を生成するFcドメインであり得る。あるいは、このマルチマー成分は、この最初の5つのアミノ酸内のシステインが、例えば、セリンまたはアラニンのような別のアミノ酸によって置換されたFcドメインであり得る。

【0014】

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子によってコードされた融合ポリペプチドを提供する。好ましくは、この融合ポリペプチドは、マルチマー成分である第3の成分の機能に起因して、マルチマー形態にある。好ましい実施形態では、このマルチマーはダイマーである。適切なマルチマー成分は、免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域(Takahashiら(1982)Cell 29:671~679)；免疫グロブリン遺伝子配列、およびその部分をコードする配列である。本発明の好ましい実施形態では、免疫グロブリン遺伝子配列、特にFcドメインをコードする遺伝子配列が、マルチマー成分をコードするために用いられる。

【0015】

本発明はまた、本明細書に記載のような本発明の核酸分子を含むベクターを企図する。

【0016】

本発明の好ましい実施形態は、配列番号2に提示される配列を有する融合ポリペプチドをコードする配列番号1に提示される配列を有する単離された核酸(ここで、この融合ポリペプチドは、サイトカインを結合して非機能的複合体を形成し得るマルチマーを形成する)；配列番号4に提示される配列を有する融合ポリペプチドをコードする配列番号3に提示される配列を有する単離された核酸分子(ここで、この融合ポリペプチドは、サイトカインを結合し、非機能的な複合体を形成する)；および配列番号6に提示される配列を有する融合ポリペプチドをコードする配列番号5で提示される配列を有する単離された核

酸分子（ここで、この融合ポリペプチドは、サイトカインを結合し、非機能的な複合体を形成する）；および上記に記載の核酸分子によってコードされる融合ポリペプチドである。

【 0 0 1 7 】

本発明のその他の好ましい実施形態は、配列番号 8、10、12、14、16、18、20、および 22 にそれぞれ提示される配列を有する融合ポリペプチドをコードする配列番号 7、9、11、13、15、17、19、21、および 23 に提示される配列を有する単離された核酸分子であり、ここで、各融合ポリペプチドは、IL-1 を結合して非機能的複合体を形成し得る。

【 0 0 1 8 】

本明細書に記載のような本発明の核酸分子を含む発現ベクターもまた提供され、ここで、この核酸分子は、発現制御配列に作動可能に連結されている。本発明の発現ベクターを含む融合ポリペプチドの産生のための宿主 - ベクター系もまた提供され、この発現ベクターは、上記融合ポリペプチドの発現のために適切な宿主細胞中に導入されている。適切な宿主細胞は、E. coli のような細菌細胞、Pichia pastoris のような酵母細胞、Spodoptera frugiperda のような昆虫細胞、または COS、CHO、293、BHK または NS0 細胞のような哺乳動物細胞である。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、本明細書に記載の宿主 - ベクター系の細胞を、上記融合ペプチドの産生を許容する条件下で増殖する工程、およびこのように産生された融合ポリペプチドを回収する工程により、本発明の融合ポリペプチドを産生する方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明によって調製された sRα : β1 ヘテロダイマーは、それらのリガンドのための有効な Trap を提供し、これらリガンドを、機能的中间体を生成することなくピコモル範囲にある親和性をもって結合する。本明細書に記載される技術は、特異性を与える α - 成分、および α - 特異性成分に結合されるときいずれの成分単独よりサイトカインに対してより高い親和性を有する β 成分を利用する任意のサイトカインのためのサイトカイン Trap を開発するために適用され得る。従って、本発明によるアンタゴニストは、インターロイキン 1 (IL-1) のアンタゴニストを含む。

【 0 0 2 1 】

α および β レセプター細胞外ドメインは、当業者に公知の方法を用いて調製され得る。本発明を実施するために有用なレセプター分子は、原核生物また真核生物発現系でクローニングおよび発現することにより調製され得る。レセプター遺伝子は、任意の数の方法を利用して発現および精製され得る。この因子をコードする遺伝子は、例えば、制限されることなく pCPI10 のような細菌発現ベクター中にサブクローンされ得る。

【 0 0 2 2 】

この組換え因子は、安定な生物学的に活性なタンパク質の次の形成を可能にする任意の技法によって精製され得る。例えば、制限されることなく、これら因子は、可溶性タンパク質として、または封入体として回収され得、そこから、これらは、8 M 塩酸グアニジウムおよび透析によって定量的に抽出され得る。これら因子をさらに精製するために、従来のイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーまたはゲル濾過が用いられ得る。

【 0 0 2 3 】

sRα : β ヘテロダイマーレセプターは、β レセプターヘテロダイマーの産生を記載する公開された PCT 出願 WO 93 / 10151 に記載のような公知の融合領域を用いて処理され得るか、またはそれらは、化学的手段による細胞外ドメインの架橋によって調製され得る。利用されるこれらドメインは、α および β 成分の全細胞外ドメインからなり得るか、またはそれらは、そのリガンドおよび sRα : β 複合体中のその他の成分と複合体を形成する能力を維持するその改変体またはフラグメントからなり得る。

【 0 0 2 4 】

本発明の1つの実施形態では、上記細胞外ドメインは、ロイシンジッパーを用いて処理される。ヒト転写因子 *c-jun* および *c-fos* のロイシンジッパードメインは、1:1 化学量論で、安定なヘテロダイマーを形成することが示されている (Buschら (1990) *Trend Genetics* 6:36-40; Gentzら (1989) *Science* 243:1695-1699)。 *jun-jun* ホモダイマーもまた形成されることが示されているが、それらは、 *jun-fos* ヘテロダイマーより約1000倍安定性がより少ない。 *fos-fos* ホモダイマーは検出されていない。

【0025】

c-jun または *c-fos* いずれかのロイシンジッパードメインは、遺伝子的に処理されたキメラ遺伝子により、上記のレセプター成分の可溶性または細胞外ドメインのC末端でフレームを合わせて (*in frame*) 融合される。これら融合は直接的であり得るか、またはそれらは、ヒトIgGのヒンジ領域のような柔軟リンカードメイン、または種々の長さおよび組み合わせの、グリシン、セリン、スレオニンまたはアラニンのような小数アミノ酸からなるポリペプチドリンカーを採用し得る。従って、上記キメラタンパク質は、His-His-His-His-His-His (His6) (配列番号25) によってタグ化され得、金属-キレートクロマトグラフィーにより、そして/または抗体が利用可能であるエピトープにより迅速な精製が可能であり、ウェスタンブロット、免疫沈降、またはバイオアッセイにおける活性枯渇/ブロックを可能にする。

【0026】

別の実施形態では、上記 $sR\alpha:\beta$ ヘテロダイマーは、ヒトIgG1のFc-ドメイン (Aruffoら (1991) *Cell* 67:35-44) を用いて精製される。後者とは対照的に、ヘテロダイマーの形成は、生化学的に達成されなければならない。なぜなら、Fc-ドメインを保持するキメラ分子は、ジスルフィド連結ホモダイマーとして発現されるからである。従って、ホモダイマーは、鎖内ジスルフィドを行わず、鎖間ジスルフィドの破壊を好む条件下で減少され得る。次いで、異なる細胞外部分をもつモノマーが、等モル量で混合され、そして酸化されてホモ-およびヘテロダイマーの混合物を形成する。この混合物の成分は、クロマトグラフィー技法により分離される。あるいは、このタイプのヘテロダイマーの形成は、遺伝子的に処理すること、およびレセプター成分の可溶性部分または細胞外部分、それに続くhIgGのFc-ドメイン、それに続く上記の *c-jun* または *c-fos* ロイシンジッパーのいずれか (Kostelnýら (1992) *J. Immunol.* 148:1547-1553) からなる分子を発現することにより偏らされ得る。これらのロイシンジッパーは、ヘテロダイマーを優勢に形成するので、それらは、所望される場合ヘテロダイマーの形成を駆動するために用いられ得る。ロイシンジッパーを用いる記載のキメラタンパク質については、これらもまた、金属キレートまたはエピトープでタグ化され得る。このタグ化ドメインは、金属-キレートクロマトグラフィーによるか、そして/または抗体による迅速な精製のために用いられ得、ウェスタンブロット、免疫沈降、またはバイオアッセイにおける活性枯渇/ブロックを可能にする。

【0027】

さらなる実施形態では、ヘテロダイマーは、ダイマーの形成を駆動するその他の免疫グロブリン由来ドメインを用いて調製され得る。このようなドメインは、例えば、IgGの重鎖 (Cg1およびCg4)、およびヒト免疫グロブリンの κ (κ) および λ (λ) 軽鎖の定常領域を含む。Cgの軽鎖とのヘテロダイマー化は、CgのCH1ドメインと軽鎖の定常領域 (CL) との間で起こり、そして単一のジスルフィド架橋による2つのドメインの共有結合により安定化される。従って、構築物は、これら免疫グロブリンドメインを用いて調製され得る。あるいは、これら免疫グロブリンドメインは、ダイマー化を駆動するT細胞レセプター成分に由来し得るドメインを含む。

【0028】

本発明の別の実施形態では、 $sRa:b1$ ヘテロダイマーが、柔軟なリンカーリングを利用するキメラ分子としての発現により調製される。このキメラタンパク質をコードするDNA構築物は、それが、柔軟なリングによってタンデム (頭から頭に) に共に融合され

10

20

30

40

50

た2つの可溶性または細胞外ドメインを発現するように設計されている。このループは、完全に人工的であり得るか（例えば、特定の間隔でセリンまたはスレオニンにより中断されたポリグリシン反復）または天然に存在するタンパク質（例えば、h I g Gのヒンジ領域）から「借用している」。分子は処理されて、融合された可溶性または細胞外ドメインの順序がスイッチされて（例えば、s I L 6 R a / ループ / s g p 1 3 0 または s g p 1 3 0 / ループ / s I L - 6 R a ）および / またはループの長さおよび組成が変化され、所望の特徴をもつ分子の選択を可能にする。

【0029】

あるいは、本発明に従って作製されたヘテロダイマーは、適切な α および β 成分で同時トランスフェクトされた細胞株から精製され得る。ヘテロダイマーは、当業者に利用可能な方法を用いてホモダイマーから分離され得る。例えば、制限された量のヘテロダイマーが、調製用の非変性ポリアクリルアミドゲルからの受動的溶出により回収され得る。あるいは、ヘテロダイマーは、高圧カチオン交換クロマトグラフィーを用いて精製され得る。優れた精製は、Mono S カチオン交換カラムを用いて得られた。

【0030】

I L - 1 関連疾患または障害を処置するために有用な効率的な用量は、当業者に公知の方法を用いて決定され得る（例えば、Finglら（1975）The Pharmacological Basis of Therapeutics、GoodmanおよびGilman編、Macmillan Publishing Co.、New York、1-46頁を参照のこと）。本発明による使用のための薬学的組成物は、インビボでの投与の前の、薬学的に受容可能な液体、固体または半固体キャリア中、キャリアまたは標的分子（例えば、抗体、ホルモン、成長因子など）に連結されて、および / またはリポソーム、マイクロカプセル、および制御放出調製物（アンタゴニスト発現細胞を含む）中に取り込まれる上記のアンタゴニストを含む。例えば、この薬学的組成物は、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液またはデキストロース溶液のような水溶液中の1つ以上のアンタゴニストを含み得る。あるいは、活性薬剤は、このような処置の必要な患者中に移植され得る固体（例えば、ワックス）または半固体（例えば、ゼラチン状）処方物中に構成され得る。投与経路は、当該分野で公知の投与の任意の様式であり得、制限されずに、静脈内、くも膜下腔内、皮下、関連する組織中への注射による、動脈内、鼻内、経口、または移植デバイスによる、を含む。

【0031】

投与は、身体全体または局所領域中の本発明の活性薬剤の分布を生じ得る。例えば、神経系の遠隔領域を含むいくつかの症状では、薬剤の静脈内またはくも膜下腔内投与が所望され得る。いくつかの状況では、活性薬剤を含むインプラントが、障害領域中またはその近傍に配置され得る。適切なインプラントは、制限されずに、発泡ゲル、ワックス、微粒子ベースのインプラントを含む。

【実施例】

【0032】

（実施例1、融合ポリペプチド成分のクローニング）

ヒトサイトカインレセプターの細胞外ドメインを、組織cDNA（CLONTECH）を用いる標準的PCR技法により得、発現ベクターpMT21（Genetics Institute、Inc.）中にクローン化し、そしてABI 373A DNAシーケンサーおよびTaq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems、Inc.、Foster City、CA）を用いる標準的な技法により配列決定した。I L - 1 R A c Pについては、Genbank配列、AB006357からのヌクレオチド1~1074（アミノ酸1~358に対応する）がクローン化された。I L - 1 R Iについては、Genbank配列X16896からのヌクレオチド55~999（アミノ酸19~333に対応する）がクローン化された。

【0033】

(実施例2、融合ポリペプチド(サイトカインTrap)の産生)

サイトカインTrapをコードするヌクレオチド配列は、標準的なクローニングおよびPCR技法により個々のクローン化DNA(上に記載)から構築された。各場合において、配列は、第1の融合ポリペプチド成分をコードする配列が、マルチマー成分としてFcドメイン(ヒンジ、ヒトIgG1のCH2およびCH3領域)が続く第2の融合ポリペプチド成分をコードする配列に融合されるようにフレームを合わせて構築された。いくつかの場合には、余分のヌクレオチドが、第1および第2の融合ポリペプチド成分をコードする配列の間にフレームを合わせて挿入され、これら2つの成分の間にリンカー領域を付加した。

【0034】

10

(実施例3、IL-1 TrapのためのMRC5バイオアッセイ)

MRC5ヒト肺線維芽細胞はIL-6を分泌することによりIL-1に応答し、そしてそれ故、IL-6のIL-1依存性産生をブロックするIL-1 Trapの能力をアッセイするために利用された。IL-1 Trap 1SC569は、Fcドメインに融合されたIL-1 Type Iレセプターの細胞外ドメインであるIL-1-RI.Fcに対して試験された。

【0035】

MRC5細胞を、培地中に 1×10^5 細胞/mlで懸濁し、そして細胞の0.1mlを96ウェル組織培養プレートのウェル中に入れる(ウェルあたり10,000細胞)。プレートを、湿潤化5%CO₂インキュベーター中37℃で24時間インキュベートする。

20

【0036】

種々の用量のIL-1 Trapおよび組換えヒトIL-1を、96ウェル組織培養ディッシュ中で予備インキュベートし、そして37℃で2時間インキュベートする。次いで、この混合物の0.1mlを、MRC5細胞を含む96ウェルプレートに、IL-1 Trapの最終濃度が10nMであり、そしてIL-1の最終濃度が2.4pM~5nMの範囲であるように添加する。コントロールウェルは、Trap単独を、または何も含まない。

【0037】

次いで、プレートを、湿潤化5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間インキュベートする。上清液を回収し、そしてR&D Systems Quatikine Immunoassay Kitを製造業者の指示に従って用い、IL-6のレベルをアッセイする。

30

【0038】

(実施例4、IL-1 Trapによるインビボの注入されたIL-1のブロック)

IL-1は、前炎症性サイトカインである。IL-1の全身投与は、一過性高血糖、低インスリン血症、発熱、食欲不振症、およびインターロイキン-6(IL-6)の増加した血清レベルを含む、動物における急性応答を惹起することが示されている(Reimers、1998)。マウスは、マウスおよびヒトIL-1の両方に応答性であるので、ヒトIL-1が用いられ得、そしてヒト特異的IL-1アンタゴニストのインビボ結合効果が評価され得る。この急性マウスモデルを用いて、ヒトIL-1 Trapの外から投与されたヒトIL-1のインビボ効果を拮抗する能力を決定した。これは、ヒトIL-1 Trapのインビボの効き目の迅速な適応症を提供し、そして分子選択を補助するためのアッセイとして用いられ得る。

40

【0039】

実験デザイン：雄のC57BL/6マウスに、組換えヒトIL-1βの皮下注射を与えた(rhIL-1β; 0.3mg/kg)。rhIL-1β投与の24時間前、動物を、ピヒクルであるヒトIL-1 Trap 569(50または150倍モル過剰; それぞれ0.18または0.54mg/kg)、または組換えマウスIL-1レセプターアンタゴニスト(rmIL-1ra; 150または750倍モル過剰; それぞれ、45.8または229μg/kg)。血液サンプルを、rhIL-1βの投与2時間後採取し、そして

50

血清を、マウス IL - 6 ELISA を用いて IL - 6 レベルについてアッセイした。rh IL - 1 β の外因性投与は、血清 IL - 6 レベルを有意に増加した。50 または 150 倍いずれかのモル過剰の h IL - 1 Trap での前処理は、IL - 6 の rh IL - 1 β - 誘導をブロックした。対照的に、150 または 750 倍いずれかのモル過剰における rm IL - 1 ra の注射は、IL - 6 誘導をブロックしなかった。

【0040】

結果、ヒト IL - 1 の外因性投与は、血清 IL - 6 レベルの劇的な誘導を生じた。150 倍モル過剰では、ヒト IL - 1 Trap は、IL - 6 増加を完全にブロックした (図 1)。さらに、ヒト IL - 1 の効果は、少なくともさらに 24 時間持続し、IL - 1 が再投与されたときでさえ、IL - 6 増加を防いだ (図 1)。このような長く続く効き目は、IL - 1 Trap の毎日の注射が、長期間適用のために必ずしも必要でないかも知れないことを示唆している。

10

【0041】

別の実験では、150 倍または 750 倍モル過剰において、IL - 1 ra は、IL 6 誘導を有意にブロックしなかった。従って、この実例では、IL - 1 Trap は、IL - 1 活性のより良好なブロッカーであるようである。

【0042】

(実施例 5、さらなる一本鎖 IL - 1 Trap の構築)

本明細書に記載された DNA ベクターを構築するために用いた技法は、当業者に周知の標準的な分子生物学技法である (例えば、Sambrook、J. E. F. Fritsch および T. Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版、第 1、2、および 3 巻、1989; Current Protocols in Molecular Biology、Ausubel 編、Greene Publ. Assoc.、Wiley Interscience、NY)。すべての DNA 配列決定は、ABI 373A DNA シークエンサーおよび Taq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、Inc.、Foster City、CA) を用いる標準的な技法により行う。

20

【0043】

(a) IL - 1 Trap 823 配列 - この IL - 1 Trap 823 配列は、ヒト IL - 1 RAcP の細胞外ドメイン (配列番号 7 のヌクレオチド 1 - 1077 に対応する) にヒト IL - 1 RI の細胞外ドメイン (配列番号 7 のヌクレオチド 1078 - 2013 に対応する) が続き、システインをグリシンに変えるヌクレオチド 2017 - 2019 における変異 (TGT - > GGA) を含むヒンジ領域であるヒト IgG1 の CH2 および CH3 ドメインの一部 (配列番号 7 のヌクレオチド 2014 - 2703) が続く。この核酸配列は、配列番号 8 に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

30

【0044】

(b) IL - 1 Trap 823 - 1198 - B 配列 - この IL - 1 Trap 823 - 1198 - B 配列は、ヒト IL - 1 RAcP の細胞外ドメイン (配列番号 9 のヌクレオチド 1 - 1077 に対応) にヒト IL - 1 RI の細胞外ドメイン (配列番号 9 のヌクレオチド 1078 - 2013 に対応) が続き、アミノ酸のストレッチ (配列番号 9 のヌクレオチド 2014 - 2019 に対応) が続き、ヒンジ領域であるヒト IgG4 の CH2 および CH3 ドメイン (配列番号 9 のヌクレオチド 2020 - 2709 に対応) が続く。この核酸配列は、配列番号 10 に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

40

【0045】

(c) IL - 1 Trap 823 - 1267 - C 配列 - この IL - 1 Trap 823 - 1267 - C 配列は、ヒト IL - 1 RAcP の細胞外ドメイン (配列番号 11 のヌクレオチド 1 - 1077 に対応) にヒト IL - 1 RI の細胞外ドメイン (配列番号 11 のヌクレオチド 1078 - 2013 に対応) が続き、アミノ酸のストレッチ (配列番号 11 のヌクレオチド 2014 - 2019 に対応) が続き、セリンをプロリンに変えるヌクレオ

50

チド2047における変異(T>C)を含むヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号11のヌクレオチド2020-2709に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号12に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

【0046】

(d) IL-1 Trap 570-FE配列-このIL-1 Trap 570-FE配列は、ヒトIL-1RIの細胞外ドメイン(配列番号1のヌクレオチド1-996に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号1のヌクレオチド997-2013に対応)が続き、システインをグリシンに変えるヌクレオチド2017-2019における変異(TGT->GGA)を含むヒンジ領域であるヒトIgG1のCH2およびCH3ドメイン(配列番号1のヌクレオチド2014-2703に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号2に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

10

【0047】

(e) IL-1 Trap 570-FE-B配列-このIL-1 Trap 570-FE-B配列は、ヒトIL-1RIの細胞外ドメイン(配列番号3のヌクレオチド1-996に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号3のヌクレオチド997-2013に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(配列番号3のヌクレオチド2014-2019に対応)が続き、ヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号3のヌクレオチド2020-2709に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号4に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

20

【0048】

(f) IL-1 Trap 570-FE-C配列-このIL-1 Trap 570-FE-C配列は、ヒトIL-1RIの細胞外ドメイン(配列番号5のヌクレオチド1-996に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号5のヌクレオチド997-2013に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(配列番号5のヌクレオチド2014-2019に対応)が続き、セリンをプロリンに変えるヌクレオチド2047における変異(T>C)を含むヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号5のヌクレオチド2020-2709に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号6に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

【0049】

(g) IL-1 Trap 1647-CtF配列-このIL-1 Trap 1647-CtF配列は、ヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号13のヌクレオチド1-1044に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号13のヌクレオチド1045-2058に対応)が続き、システインをグリシンに変えるヌクレオチド2062-2064における変異(TGT->GGA)を含むヒンジ領域であるヒトIgG1のCH2およびCH3ドメインの一部(配列番号13のヌクレオチド2059-2748に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号14に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

30

【0050】

(h) IL-1 Trap 1647-CtF-B配列-このIL-1 Trap 1647-CtF-B配列は、ヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号15のヌクレオチド1-1044に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号15のヌクレオチド1045-2058に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(配列番号15のヌクレオチド2059-2064に対応)が続き、ヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号15のヌクレオチド2065-2754に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号16に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

40

【0051】

(i) IL-1 Trap 1647-CtF-C配列-このIL-1 Trap 1647-CtF-C配列は、ヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号17のヌクレオチド1-1044に対応)にヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号17

50

のヌクレオチド1045 - 2058に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(配列番号17のヌクレオチド2059 - 2064に対応)が続き、セリンをプロリンに変えるヌクレオチド2092における変異(T > C)を含むヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号17のヌクレオチド2065 - 2754に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号17に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

【0052】

(j) IL-1 Trap 1649配列 - このIL-1 Trap 1649配列は、ヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号19のヌクレオチド1 - 1074に対応)にヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号19のヌクレオチド1075 - 2058に対応)が続き、システインをグリシンに変えるヌクレオチド2062 - 2064における変異(TGT - > GGA)を含むヒンジ領域であるヒトIgG1のCH2およびCH3ドメインの一部(配列番号19のヌクレオチド2059 - 2748に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号20に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

10

【0053】

(k) IL-1 Trap 1649 - B配列 - このIL-1 Trap 1649 - B配列は、ヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号21のヌクレオチド1 - 1074に対応)にヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号21のヌクレオチド1075 - 2058に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(ヌクレオチド2059 - 2064に対応)が続き、ヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号21のヌクレオチド2065 - 2754に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号22に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

20

【0054】

(l) IL-1 Trap 1649 - C配列 - このIL-1 Trap 1649 - C配列は、ヒトIL-1RAcPの細胞外ドメイン(配列番号23のヌクレオチド1 - 1074に対応)にヒトIL-1RIIの細胞外ドメイン(配列番号23のヌクレオチド1075 - 2058に対応)が続き、アミノ酸のストレッチ(ヌクレオチド2059 - 2064に対応)が続き、セリンをプロリンに変えるヌクレオチド2092における変異(T > C)を含むヒンジ領域であるヒトIgG4のCH2およびCH3ドメイン(配列番号23のヌクレオチド2065 - 2754に対応)が続く。この核酸配列は、配列番号24に提示されるような融合ポリペプチド配列をコードする。

30

【0055】

前述に記載される配列に加え、これら配列に対する以下の改変もまた主題の発明によって企図される。

1. IL1 Trapである823、823 - 1198、B、および823 - 1267、Cについて：AcP代替物：アミノ酸をLysからThrに変えるAからCへのヌクレオチド1043における変化。SG挿入物：ヌクレオチド1077と1078との間のヌクレオチドTCC GGAの挿入は、このTrapの2つのレセプタードメイン間にアミノ酸のSer Glyストレッチを付加し得る。

2. IL1 Trapである570 - FE、570 - FE、B、および570 - FE、Cについて：AcP代替物：アミノ酸をLysからThrに変えるAからCへのヌクレオチド1979における変化。SG挿入物：ヌクレオチド996と997との間のヌクレオチドTCC GGAの挿入は、このTrapの2つのレセプタードメイン間にアミノ酸のSer Glyストレッチを付加し得る。

40

3. IL1 Trapである1647 - CtF、1647 - CtF、B、および1647 - CtF、C：AcP代替物：アミノ酸をLysからThrに変えるAからCへのヌクレオチド2027における変化。SG挿入物：ヌクレオチド1044と1045との間のヌクレオチドTCC GGAの挿入は、このTrapの2つのレセプタードメイン間にアミノ酸のSer Glyストレッチを付加し得る。

4. IL1 Trapである1649、1649 - B、および1649 - C：AcP代替

50

物：アミノ酸を L y s から T h r に変える A から C へのヌクレオチド 1 0 4 3 における変化。S G 挿入物：ヌクレオチド 1 0 7 4 と 1 0 7 5 との間のヌクレオチド T C C G G A の挿入は、この T r a p の 2 つのレセプタードメイン間にアミノ酸の S e r G l y ストレッチを付加し得る。

【 0 0 5 6 】

さらに、当業者は、F c ドメインが異なるアロタイプをもつ免疫グロブリンに由来する I L 1 T r a p を構築することが所望され得ることを認識する。上述に記載の改変のいずれも I L 1 を結合する T r a p の能力を改変しない。

【 0 0 5 7 】

(実施例 6、ヒト I L - 1 T r a p は、炎症関節における I L - 1 の効果をブロックする)

10

背景：ザイモサンは、膝に注射されるとき、関節における急性炎症および I L - 1 β の上方制御を引き起こす酵母細胞壁抽出物である (J o o s t e n ら (1994) C l i n E x p I m m u n o l 97:204-211)。軟骨細胞は、関節中の軟骨の漸進的破壊に寄与するヒト関節炎の特徴であるプロテオグリカン合成を下方制御することによりこの炎症および I L - 1 β に応答する。I L - 1 β に対するアンタゴニストは、I L - 1 β におけるザイモサン誘導上昇の効果をブロックするそれらの能力を上昇するために用いられ得る。

【 0 0 5 8 】

材料および方法：麻酔された雄の C 5 7 B L / 6 マウス (T a c o n i c) に、膝蓋靱帯を通じて右膝関節中にザイモサン A (S i g m a ; 1 0 μ l 中 3 0 0 μ g) の関節内 (i . a .) 注射を与えた。滅菌 P B S を、膝蓋靱帯を通じて左膝関節中に i . a . 注射した (1 0 μ l)。i . a . 注射の 2 4 時間前、動物を、ビヒクルまたは h I L - 1 T r a p 5 6 9 のいずれかで処理した (1 9 m g / k g , s . c .)。膝蓋を、v a n d e n B e r g ら (1982) 上述に記載されるようにプロテオグリカン合成を測定するためにザイモサンの注射の 2 4 時間後に取り除いた。簡単に述べれば、各々の膝蓋およびともなう靱帯を、1 0 μ C i / m l の 35 S - 硫酸塩 (N E N D u P o n t) を含む培地 (H E P E S、H C O $_3$ 、グルタミン & ペニシリン / ストレプトマイシンを含む R P M I) 中、3 7、5 % C O $_2$ で 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、組織を洗浄し、そして 1 0 % ホルマリン (V W R) 中で一晩固定した。この組織を、次に、周

20

30

【 0 0 5 9 】

結果：ザイモサンの関節内注射は、ビヒクル注射に対し約 5 0 % プロテオグリカン合成を減少する (図 3)。ザイモサン注射前の h I L - 1 T r a p の投与は、I L - 1 β の局所作用をブロックし、そしてプロテオグリカン合成は、コントロールの約 9 0 % まで戻った。これらのデータは、h I L - 1 T r a p 5 6 9 が皮下注射後関節を貫通し得、これら関節内の I L - 1 の生物学的効果を効率的に中和することを示す。

40

【 0 0 6 0 】

(実施例 7、マウス I L - 1 T r a p は、サイモサン加速コラーゲン誘導関節炎 (C I A) モデルにおける関節炎症状の重篤度を減少する)

背景：I L - 1 は、慢性関節リウマチにおける炎症および軟骨破壊の発症に関係している (D i n a r e l l o (1996) B l o o d 87(6):2095-2147; W o o l e y ら (1993) A r t h r i t i s & R h e u m a t i s m 36(9):1305-1314)。コラーゲン誘導関節炎 (C I A) は、慢性関節リウマチに類似性を有する炎症性の多発性関節炎の広く研究された動物モデルであり；共通の組織病理学的特徴

50

は、関節炎症および腐食、滑膜仮形成および炎症細胞浸潤を含む (Joeら (1999) Mol Med Today 5:367-369)。従前の研究は、種々の抗-IL-1処置が、CIA動物における関節炎症状を減少することに関しポジティブな影響を有することを示し (van den Bergら (1994) Clin Exp Immunol 95:237-243; Joostenら (1999) J Immunol 163:5049-5055; van de Looら (1992) J Rheumatol 19:348-356)、本出願人は、この動物モデルにおける関節炎症状の進行に対する上記IL-1 Trapのマウスバージョン (mIL-1 Trap)の影響を調べた。IL-1 Trapのヒトバージョンは、げっ歯類IL-1とは乏しい交差反応性である。このmIL-1 Trapは、マウスIL-1 RAcPの細胞外ドメイン、それに続くマウスIL-1 RIの細胞外ドメイン、それに続くヒンジであるマウスIgG2aのCH2およびCH3ドメインからなる。

10

【0061】

材料および方法．雄のDBA-1マウス (Jackson Laboratories) を、尾の基部の皮内に、完全および不完全Freundアジュバント (2:1:1比; Chondrex) で乳化した100 µg / 50 µlのウシII型コラーゲン (CII; Chondrex) で免疫化し、そして21日目に、不完全Freundアジュバントで乳化したCII (100 µg / 50 µl) で皮内にブーストした。DBA-1マウスにおけるCIAは、低発生率で長期間に亘り漸進的に生じるので (Joostenら (1994) Clin Exp Immunol 97:204-211)、本出願人は、30日目に3mg ザイモサン (Sigma) を動物に腹腔内に注射することにより関節炎症状の発症を同期した。ザイモサン注射の2時間前に、マウスを処置群にランダムに分配し、そしてビヒクルまたはmIL-1 Trap (31または10 mg / kg、3 × / 週、8注射、s.c.) のいずれかで注射した。足における関節炎症状 (Wooleyら (1993) Arthritis & Rheumatism 36 (9):1305-1314によって記載されるようなASISコア) を、処置群を理解できない個人によって、3 × / 週評価した。動物を8回目の注射の24時間後屠殺し、その時点でASISコアとともに足の幅を測定した。

20

【0062】

結果．ザイモサンのi.p.注射後5日以内に、ビヒクルで処理された動物は、mIL-1 Trapを受けている動物と比較してASISコアにおける有意な増加を有し、症状は、ザイモサン注射の10~14日後最大に到達した。マウスIL-1 Trapは、10 mg / Kg Trapを受けている動物が、31 mg / kgを受けている動物より多い関節炎症状 (より大きなASISコア) を有したように、用量依存様式で作用した。しかし、両方のmIL-1 Trap処置群は、ビヒクルより有意により低い程度の関節炎症状を有していた。ASISコアにおけるこの差異はまた、屠殺の時点における足の幅に反映されている (図5)。mIL-1 Trapを受ける動物は、ネイティブの非コラーゲン免疫化動物のそれと同様であった。これらのデータは、mIL-1 Trapが、IL-1を効率的に中和し得、そして関節炎関節の発症をブロックすることを示す。

30

【0063】

(実施例8、IL-1 Trap 1649は、IL-1 βの活性をブロックし得る)
種々の濃度のIL-1 Trap 1649を、5 pMのヒトIL-1 bの存在下、室温で一晩インキュベートした。これら混合物を、次いで、37 °C、5 % CO₂ で5時間の間、293-NFκB細胞の2連のウェル (20,000細胞/ウェル) に添加した。293-NFκB細胞は、5 NFκB部位を含むプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ遺伝子を所有する安定に組み込まれたレポータープラスミドを含む。IL-1 bの添加は、増加したルシフェラーゼ遺伝子発現を生じる。Steady-Glo試薬 (Promega) を、室温で15分間細胞に添加し、そしてルシフェラーゼ遺伝子発現を、照度測定により相対光単位 (RLU) として定量した。IL-1 Trap 1649は、約30 pMのK_dを示す32 pMのIC₅₀を示す (図6)。これらのデータは、IL-1

40

50

Trap 1649 が IL - 1 をブロックする能力を有することを示す。

【 0 0 6 4 】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって制限されることはない。実際、本明細書に記載のこれらに加えて本発明の種々の改変が、先行する記載および添付の図面から当業者に明らかになる。このような改変は、添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 5 】

【図 1】ヒト IL - 1 Trap は、外因的に投与された hu IL - 1 のインビボの効果をブロックする。BALB / c マウスは、時間 0 に hu IL - 1 (0 . 3 μ g / K g) の皮下注射を受けた。hu IL - 1 注射の 24 時間前に、動物は、ビヒクルまたは 150 倍モル過剰の hu IL - 1 Trap のいずれかで予備処理された。屠殺の 2 時間前 (26 時間)、マウスは、hu IL - 1 の第 2 の注射 (0 . 3 μ g / k g 、 s . c .) により再抗原投与された。種々の時間点で血液サンプルを収集し、そして血清を IL - 1 レベルについてアッセイした (平均 $\pm$ S E M として表した ; 1 群あたり n = 5)。

【図 2】ヒト IL - 1 Trap は、外因的に投与されたヒト IL - 1 のインビボの効果をブロックする。

【図 3】ヒト IL - 1 Trap は、腫れ上がった関節の影響をブロックする。

【図 4】マウス IL - 1 Trap は、ザイモサン増強コラーゲン誘導関節炎 (C I A) モデルにおける関節炎症状の重篤度を減少する。

【図 5】マウス IL - 1 Trap は、ザイモサン増強コラーゲン誘導関節炎 (C I A) モデルにおける関節炎症状の重篤度を減少する。

【図 6】種々の濃度の IL - 1 Trap 1649 を、5 p M のヒト IL - 1 b の存在下、室温で一晩インキュベートした。

【図 1】

【図 3】

Figure 1

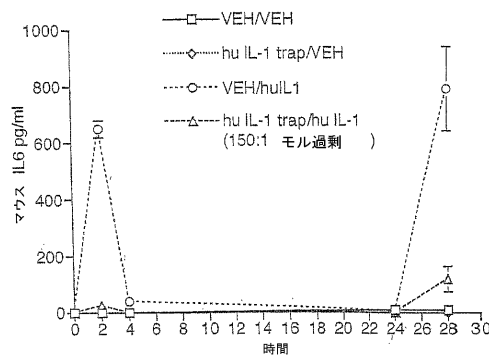
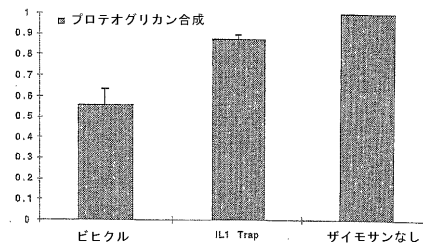
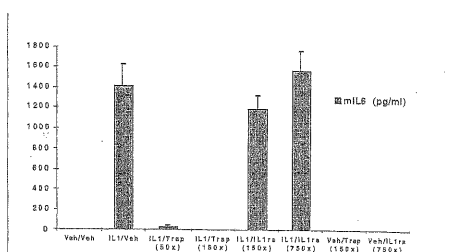


Figure 3



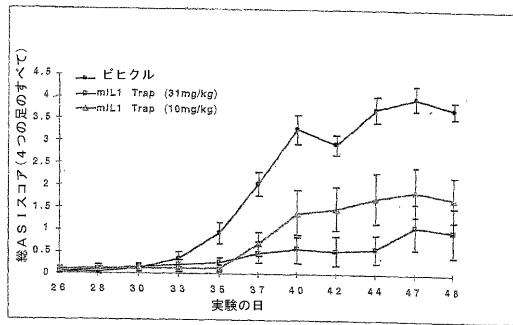
【図 2】

Figure 2



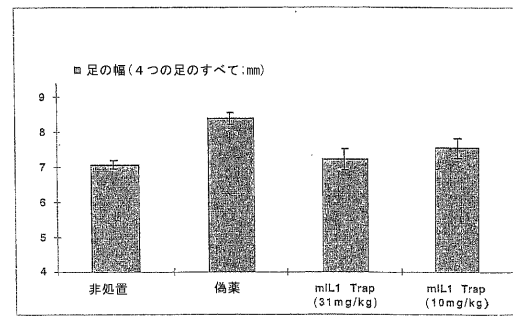
【図 4】

Figure 4



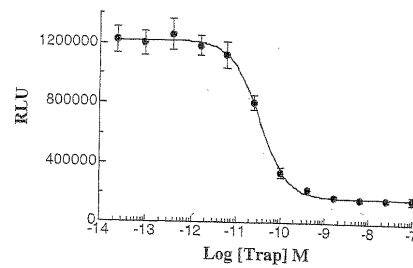
【図 5】

Figure 5



【図 6】

Figure 6



【配列表】

0004387309000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 スタール, ネイル

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10512, カーメル, ケント ショア ドライブ 48

(72)発明者 ヤンコボーロス, ジョージ ディー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10598, ヨークタウン ハイツ, バプティスト チャー
チ ロード 1519

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 欧州特許出願公開第01229047(E P, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq